

ORGAN-PROTECTING AGENT CONTAINING HUMAN ADF

Publication number: JP5139992
Publication date: 1993-06-08
Inventor: WADA HIROMI; YOKOMISE HIROYASU; FUKUSE TATSURO; MITSUI AKIRA; HIRAKAWA TADASHI; YODOI JIYUNJI
Applicant: AJINOMOTO KK; YODOI JIYUNJI
Classification:
- International: A61K38/00; A61K38/44; A61P43/00; A61K38/00; A61K38/43; A61P43/00; (IPC1-7): A61K37/02; A61K37/50; C07K13/00
- European:
Application number: JP19910297189 19911113
Priority number(s): JP19910297189 19911113

[Report a data error here](#)

Abstract of JP5139992

PURPOSE: To provide the subject protecting agent containing a polypeptide having a human ADF activity as an active ingredient and useful for protecting organs from damages caused by active oxygen on organ transplantation or ischemic reperfusion diseases. **CONSTITUTION:** The objective protecting agent contains a polypeptide having a human ADF activity (preferably a polypeptide comprising 104 amino acids started from the N-terminal valine represented by the sequence number 1 in the sequence table, and a peptide having a structure to whose end a methionine is addition-reacted) as an active ingredient, and further, if necessary, an excipient and a stabilizer. The polypeptide is obtained e.g. by culturing a man- originated cell strain (e.g. ATL-2 cell) and subsequently purifying the polypeptide from the cultured solution, etc., by a method such as a salting-out method, a gel chromatography, etc. The content of the human ADF is preferably 10-80 pts.wt. per 100 pts.wt. of the protecting agent, and the protecting agent is administered at a dose of 10mg to 10mg/kg once to several times a day.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-139992

(43) 公開日 平成5年(1993)6月8日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序号整理番号	F i	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02	A G Z	8314-4C		
37/50	A D S	8314-4C		
// C 0 7 K 13/00	Z N A	7731-4H		

審査請求 未請求 請求項の数4 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平3-297189	(71) 出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)11月13日	(71) 出願人	591253227 淀井 淳司 京都府京都市左京区北白川西瀬ノ内町39
		(72) 発明者	和田 洋巳 滋賀県大津市青郷2丁目32-16
		(72) 発明者	横見瀬 裕保 京都市左京区岩倉三宅町380-6長瀬方
		(72) 発明者	福瀬 達彦 京都市左京区田中西大久保町17メゾン福島 3C号
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトADFを含有する臓器保護剤

(57) 【要約】

【目的】 臓器移植及び虚血性再灌流障害の際に臓器を活性酸素による障害から保護する薬剤の提供である。

【構成】 本発明はヒトADFを含有する臓器保護剤である。

【効果】 本発明の臓器保護剤は臓器移植及び虚血性再灌流障害の際に各臓器を極めて効果的に保護する作用を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトADF活性を有するポリペプチドを有効成分として含有する臓器保護剤。

【請求項2】 ヒトADF活性を有するポリペプチドが配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するものである請求項1記載の臓器保護剤。

【請求項3】 ヒトADF活性を有するポリペプチドが配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のN末端にメチオニンが付加されたものである請求項1記載の臓器保護剤。

【請求項4】 ヒトADF活性を有するポリペプチドが大腸菌で生産されたものである請求項1、2又は3記載の臓器保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト成人T細胞白血病由来因子（以下ヒトADFと称する）活性を有するポリペプチドを有効成分とする臓器保護剤に関する。

【0002】

【従来技術】 ヒトADFはATL-2細胞の上清に存在するIL-2レセプター誘導因子として1985年多賀谷らによって報告され、そのアミノ酸配列及びDNA配列も既に決定され、更に大腸菌での生産についても報告されている（特開平1-85097号公報）。また、ヒトADFはその後の解析により、大腸菌からは乳動物にいたるまで広く存在する酸化還元酵素であるチオレドキシンと類似のアミノ酸配列を持つことが明らかになった。従って、研究者によっては本物質をチオレドキシンと呼ぶ場合もあるが、本発明に於いては、従来どおりヒトADFという名称で統一することにする。尚、ヒトADFは現在、抗炎症剤、放射線防護剤として利用が検討されている（特開平3-204818号公報）。

【0003】 さて、生体が虚血状態に陥ると組織の壊死が進行する。ここに再び血流が再開（再灌流）し組織が再酸素化を受けると、むしろ重大な障害がもたらされる（Hearse, D. J. : J. Mol. Cell. Cardiol., 9, 605-616 (1977)）。このような虚血再灌流障害には、フリーラジカルや活性酸素が関与するらしい事が、近年明らかになってきた。即ち、生体内に活性酸素が発生すると蛋白質の変性、核酸の切断、脂質の過酸化が引き起こされる。一方生体内にはグルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ（SODと称される）、カタラーゼなどの活性酸素消去酵素、修復酵素が存在し生体を保護しているが、大量の活性酸素が発生した場合には、消去、修復が追いつかない。その結果、組織に障害が引き起こされるのである（井上正康（監訳）：活性酸素と疾患，学会出版，東京（1987））。この虚血再灌流障害は、近年臨床の間でも問題になっており、最も重要なのは心疾患と臓器移植である。心疾患の手術時には、一旦心臓を

停止させ冠動脈の血流が停止し心臓に虚血状態が引き起こされる。術後、心拍動を再開したとき冠動脈の血流が再開し、この再灌流により組織内に大量に活性酸素が発生し臓器障害が引き起こされるのである。具体的には、開心術、心筋梗塞に対するTPCA（経皮的冠動脈形成術）やPTCR（冠内血栓溶解療法）においてである。

【0004】 また臓器移植においても、拒絶反応の克服と共に、虚血再灌流性臓器障害の克服が移植の成功を左右する大きな因子であることが近年認識された。即ち、提供者から臓器を取り出す時、臓器内の血流が停止（虚血）する。そして、患者の体内に着出臓器を移植したとき血流が再開（再灌流）するが、この時に虚血再灌流に伴う活性酸素が発生し、その結果、臓器障害が引き起こされるのである。従って、虚血時間が長ければ長いほど臓器障害の度合いが大きくなるので、臓器摘出後出来るだけ迅速に移植を行う必要がある。これ故、提供者が現れても遠隔地の場合には保存時間の関係から移植を断念せざるを得ないケースもある。摘出臓器の長期保存可能な薬剤が開発されれば、移植しか治療手段のない患者をさらに多く救う事が出来ると考えられる。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は臓器移植などに於いて移植臓器の損傷を軽減し移植成績を大幅に向上させる臓器保護剤、虚血再灌流臓器障害を伴う心臓、脳、消化器などを活性酸素から保護する臓器保護剤の提供である。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は上記課題を解決する為に鋭意検討を行った結果、ヒトADF活性を有するポリペプチドが優れた臓器保護作用を有する事を見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明はヒトADF活性を有するポリペプチドを有効成分として含有する臓器保護剤である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0007】 本発明で用いられるヒトADF活性を有するポリペプチド（以下、ヒトADFと略する）としては通常、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するものが用いられるが、これに限定される訳ではない。即ち、ヒトADF活性がある限り、N末端にメチオニン残基が付加されたポリペプチド、化学修飾、塩基置換法によりアミノ酸配列に置換が加わったポリペプチド、アミノ酸配列の一部に欠損があるポリペプチド、アミノ酸残基の挿入があるポリペプチド、あるいは側鎖に糖鎖等が付加されたポリペプチドであってもよい。しかし、好ましくは配列表の配列番号1に示されているN末端残基から始まる104個のアミノ酸からなるポリペプチド及びメチオニンがN末端に付加された構造を持つポリペプチドが好ましい。

【0008】 本発明で使用されるヒトADFは如何なる

3

方法で製造しても良いが、通常は以下に示す方法で製造する。即ち、①ヒト由来細胞株（例えばATL-2細胞等）を培養し、その培養液または細胞抽出液から、塩析、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、逆相クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどの一般に用いられる手法により精製し、目的とするヒトADFを得る方法（特開平1-85097、特開平62-19532参照）、②遺伝子組換え法により、ヒトADFのcDNAまたはゲノム遺伝子を大腸菌、枯草菌、酵母、高等動物細胞、植物細胞などの宿主細胞に導入し、宿主細胞内で組換えヒトADFを発現させ、その後①に記したような手法を用いて精製する方法（特開平1-85097号参照）、更には④ペプチド化学合成法により、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを合成する方法である。

【0009】本発明のヒトADFは、E202などの活性酸素を消去する事が出来、更には活性酸素により変性失活した蛋白をリフォールディングにより再活性化する事もできる。従って、活性酸素による組織障害から臓器を保護する薬剤として用いることが出来る。例えば、腎臓、肝臓、肺、心臓などの臓器保存液に添加する事により移植後の活性酸素による臓器障害を未然に防ぐ事が出来る。また臓器移植時及び心虚血、脳虚血を伴う疾患の手術時に、点滴、静注などにより投与する事によって活性酸素による臓器障害を防ぐ事が出来る。更にヒトADFはヒト由来の蛋白質であるので、人体に投与しても異物として認識されず毒性は非常に低い。尚、ヒトADFの安全性は動物実験により確認済みである。

【0010】さて、ヒトADFの剤型はヒトADFを蒸留水又は適当な緩衝液に溶かしたものを用いても良いし、また凍結乾燥処理したものを用いても良い。また、マンニトール、サイクロデキストリン等の賦形剤、安定剤を本発明の臓器保護剤に含有させても良い。ヒトADFを本発明の臓器保護剤として用いるとき、ヒトADF*

動脈血酸素分圧の経時変化

再灌流後の時間(分)				
	0	1	10	30
ADF投与群	139	80	46	113
非投与群	143	33	39	53

単位 torr

【0014】

50 【表2】

4

*の含量は通常、臓器保護剤100重量部当たり0.1-100重量部、好ましくは10-80重量部である。もちろん、上記範囲に限定されるわけではない。ヒトADFを含有する臓器保護剤を患者に投与する場合、患者の症状、疾患に応じて投与量を決めれば良いが、通常体重1Kg当たり1μgから100mg、好ましくは10μgから100mgの用量を術前、術中、術後の何れかの時期に1回から数回投与すれば良い。以下、本発明を実施例に基づいて説明する。

10

【実施例】

【実施例1】ヒトリコンビナントADFの臓器保護効果

果

体重250-300gのウイスターラット（雄及び雌の両方、実験群あたり各5匹）を実験動物として使用した。吸入麻酔剤エトレンにより麻酔を導入し、次に硫酸アトロピン0.01mg/bodyを皮下注射した後、再び麻酔剤ネンブアル25mg/kgを腹腔内に投与した。気管内挿管の後、人工呼吸器を用いて1回の喚起量2mlで喚起回数80回/分という条件（吸入酸素濃度:F102=21%）で喚起を継続して行った。左胸を開き、主肺動脈、主気管支、主肺静脈を組織から剥離し、左上大静脈よりヘパリン0.1mlを投与した。その後、肺動脈、気管支、肺静脈にクリップをかけ1時間阻血状態にした。そして1時間後クリップをはずし再灌流した。再灌流後0.1、1.0及び30分以下大動脈から採血を行いガス分析を行った。尚、体重1kg当たり15mgのヒトADFを再灌流直前に左上大静脈より投与した。

30

【0012】本発明で用いたヒトADFは大腸菌を宿主にして、遺伝子組換え法で作成したもので、配列表の配列番号1記載のN末端がバリンでアミノ酸数104個のポリペプチドを用いた。結果は表1、2に示した。

【0013】

【表1】

動脈流二酸化炭素分圧の経時変化

	再灌流後の時間(分)			
	0	1	10	30
A D F 投与群	41	44	58	41
非投与群	41	65	80	88

単位 t o r r

【0015】表1及び2は肺のガス交換能を示し、ヒト A D F 非投与群では再灌流によるガス交換能の低下に伴い動脈血酸素分圧の急激な低下(表1)及び動脈血二酸化炭素分圧の上昇をきたし(表2)、再灌流発生後30分後でも正常値に回復しなかった。一方、ヒト A D F 投与群では再灌流発生後30分後には、動脈血酸素分圧も動脈血二酸化炭素分圧共に正常値近くまで回復した(表1及び2)。また、再灌流により生じた組織障害の一つである肺浮腫の程度を示す肺湿乾重量比を測定するとヒト A D F 投与群が 5.38 ± 0.22 であり、一方非投与群が 7.29 ± 0.94 であった。統計処理を行ったところ、ヒト A D F 投与群では有意に浮腫の形成が抑制されているのが確認できた。尚、測定は再灌流発生後30分後に行った。以上の結果から、ヒト A D F は虚血再灌流により生じた肺を障害から保護する優れた機能を有することが確認できた。

【0016】(実施例2)ヒトリコンピナント A D F の 30
虚血再灌流足浮腫抑制効果

マウス(d dy 種、雌、30g、実験群あたり15匹)*

浮腫抑制効果

	A D F 投与量 (mg / kg)			
	0.01	0.1	1.0	10
浮腫抑制の認め れた個体の割合 (%)	45	57	62	85

【0018】表3に示すように、ヒト A D F には優れた浮腫抑制効果が認められた。また、投与量の増加に伴い、浮腫抑制効果も増大した。尚、10mg/kg 投与しても急性毒性が認められなかった。これより、ヒト A D F は極めて安全な薬剤と考えられる。

*の右後ろ足を事務用ゴムバンド(直径42mm)で縛り虚血状態にした。20分後にゴムバンドを除き再灌流を行うと、虚血再灌流性組織障害が発生し、右後ろ足に浮腫が形成された。この浮腫の程度は1時間後にマイクロメーターで足の厚さを測定することにより数値化した。即ち、非投与群では、平均1mm前後の足の厚れが観察された。さて、ヒト A D F の投与は虚血直前に尾静脈から行い、効果判定は次のように行った。非投与群の平均一標準偏差よりも浮腫の程度が少なかった個体を浮腫抑制の認められた個体とした。結果は表3に示した。また、ヒト A D F の投与量は、マウス1kg 当りそれぞれ0.01mg/kg、0.1mg/kg、1.0mg/kg 及び10mg/kg とした。尚、ヒト A D F は大腸菌を宿主にして、遺伝子組換え法で作成したもので、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドのN末端にメチオニンが付加されたものを用いた。

【0017】

【表3】

【0019】

【発明の効果】本発明のヒト A D F は虚血再灌流による臓器障害の防護効果を示すことより、虚血再灌流による活性酸素の発生を伴う各種臓器移植、心疾患、脳疾患の際の各種臓器の保護剤として、臨床的に応用が期待でき

7

る。ヒトADFはラジカルスカベンジャー作用を有するので、虚血再灌流性臓器障害の治療、予防剤としても利用できる。

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：104

配列の型：アミノ酸

8

トポロジ：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：ヒト

株名：ATI-2

配列の特徴

特徴を決定した方法：E

配列

1	5
10	15
Val Lys Gln Ile	Glu Ser Lys Thr Ala
Phe Gln Glu Ala	Leu Asp Ala
	20
	25
	30
Ala Gly Asp Lys	Leu Val Val Val Asp
Phe Ser Ala Thr	Trp Cys Gly
	35
	40
	45
Pro Cys Lys Met	Ile Lys Pro Phe Phe
His Ser Leu Ser	Glu Lys Tyr
	50
	55
	60
Ser Asn Val Ile	Phe Leu Glu Val Asp
Val Asp Asp Cys	Gln Asp Val
	65
	70
	75
Ala Ser Glu Cys	Glu Val Lys Cys Met
Pro Thr Phe Gln	Phe Phe Lys
	80
	85
	90
Lys Gly Gln Lys	Val Gly Glu Phe Ser
Gly Ala Asn Lys	Glu Lys Leu
	95
	100
Glu Ala Thr Ile	Asn Glu Leu Val

フロントページの続き

(72)発明者 三井 彰
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 平川 忠
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 淀井 淳司
京都市左京区北白川西瀬ノ内町39